

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/024920 A1(51) 国際特許分類:
C12N 15/12, A61K
31/7088, 38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 25/00, 25/14,
25/14, 25/16, 25/28, C07K 16/18, C12Q 1/68, G01N
33/15, 33/50, 33/53, 33/566(74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.);
〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-
aka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011631

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 11 日 (11.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-269091 2002 年 9 月 13 日 (13.09.2002) JP(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松井 英起
(MATSUI, Hideki) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば
市 並木 4 丁目 1 6-1-7 0 8 Ibaraki (JP). 渡邊 知倫
(WATANABE, Tomomichi) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県
つくば市 松代 3 丁目 1 2-1-5 0 3 Ibaraki (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) 発明の名称: 神経変性疾患の予防・治療剤

(57) Abstract: A compound or its salt inhibiting the activity of a protein, a compound inhibiting the expression of a gene of the above protein, an antisense polynucleotide, an antibody, etc. which are usable as preventives/remedies for neurodegenerative diseases, diabetes and so on. A compound or its salt promoting the activity of the protein, a compound promoting the expression of a gene of the protein, etc. which are usable as preventives/remedies for cancer, rheumatoid diseases and so on.

(57) 要約: 本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明の抗体などは、神経変性疾患、糖尿病などの予防・治療剤として使用することができ、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩、該タンパク質の遺伝子の発現を促進する化合物などは、癌、リウマチ性疾患などの予防・治療剤として使用することができる。

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

神経変性疾患の予防・治療剤

5 技術分野

本発明は、神経変性疾患の予防・治療剤および診断薬などに関する。さらに詳しくは、糖尿病、癌、リウマチ性疾患の予防・治療剤、診断薬、該予防・治療剤のスクリーニングなどに関する。

10 背景技術

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) は進行性痴呆および認知能力の失調を伴う神経変性疾患の代表的なものであるが、これまでに効果的な治療法は見出されていない。アルツハイマー病は高齢化社会を迎えつつある現在において最も重要な疾患の一つであることは言うまでもなくその治療薬の開発は医療経済的にも極めて大きな意義を有する。

15

一方、ヒートショックやグルコース飢餓などタンパク質の生合成に影響を与える因子により小胞体に異常タンパク質が蓄積し、小胞体にストレスがかかることが知られている (小胞体ストレス)。生体に小胞体ストレスがかかると、シャペロン分子をはじめとする小胞体ストレス応答遺伝子群が発現し、異常タンパク質を修復または分解し、恒常性の維持を行なう。

20

近年、種々の神経変性疾患と小胞体ストレスとの関連性が重要視されるようになった。遺伝性のパーキンソン氏病である常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (AR-JP) の病因遺伝子としてParkinが同定され (Nature, 392巻, 605-608頁, 1998年)、タンパク分解系に関与するユビキチンリガーゼであることが報告されている (Nat. Genet, 25巻, 302-305頁, 2000年)。さらにParkinの基質としてPael (Parkin associated endothelin receptor-like) 受容体が同定された。この受容体は高次構造形成が困難なタンパク質で、このタンパク質の高次構造形成不全体は通常、速やかにParkinの作用で分解されるが、タンパク質分解系を抑制すると、異常Pael受容体が小胞体に蓄積し、その細胞は小

25

胞体ストレスによる細胞死に陥ることが報告されている (Cell, 105巻, 891-902頁, 2001年)。さらに家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリン1の変異を有する細胞が小胞体ストレスに対して脆弱となること、および、小胞体ストレス応答に関与するIrelの欠失により β アミロイドの産生が上昇すること (Biochem. Biophysic. Acta, 1536巻, 85-96頁, 2001年; J. Biol. Chem., 276巻, 2108-2114頁, 2001年) が報告されている。

一方、遺伝子発現を網羅的に解析するために、cDNAまたはオリゴヌクレオチドを固定化したマイクロアレイ法が開発され、疾患特異的な遺伝子発現の変化を見出す技術が普及し、その有用性が確認されている。例えば、Affymetrix社のGeneChipシステムは癌などの疾患の診断や創薬標的遺伝子の発見に多用されつつある。

Neuronal cell death inducible putative kinase (NIPK) は、ラット由来の細胞においてNGF飢餓やカルシウムイオノフォア刺激により発現上昇し、その翻訳領域にキナーゼドメインを有することが報告されている (BBRC, 258巻, 260-264頁, 1999年)。最近、NIPKが転写因子であるATF4と結合し、転写活性を制御すること (Oncogene 22巻, 2823-2835頁, 2003年; Experimental Cell Research 286巻, 308-320頁, 2003年)、NIPKがインシュリンのシグナル伝達分子であるAkt1と結合し、そのシグナルを負に制御すること (Science 300巻, 1574-1577頁, 2003年) が報告されている。Akt1のシグナル伝達経路の活性化は、癌およびリウマチ性疾患の病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。癌抑制遺伝子であるPTENはAkt1を不活性化しているが、多くの癌ではDNA変異によりPTENの機能が欠失してAkt1が恒常的に活性化しており、これが細胞の癌化と悪性化に重要な役割を果たしている (Nature Reviews Cancer 2巻, 489-501頁, 2002年)。また、リウマチ患者の滑膜細胞ではAkt1活性が亢進しており、かつ、Akt1の機能を抑制することによりアポトーシスを誘導できることから、Akt1の活性化が滑膜細胞の増殖を伴うリウマチ性疾患の病態形成変化に重要な役割を果たしていることが示唆されている (Arthritis Rheum. 44巻, 1555-1567頁, 2001年)。

安全で優れた神経変性疾患または糖尿病などの予防・治療剤が求められてい

る。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、小胞体
5 ストレスを伴う神経細胞死誘導の時に発現が顕著に増加する遺伝子を見出し、
さらに、該遺伝子が小胞体ストレス依存性の細胞死を促進することも見出し、
これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至っ
た。

すなわち、本発明は、

- 10 (1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の
活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる神経変性疾患または糖尿病
の予防・治療剤、
- 15 (2) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の
遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる神経変性疾患また
は糖尿病の予防・治療剤、
- 20 (3) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリ
ヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはそ
の一部分を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、
- (4) 上記(3)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (5) 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤である上記(4)記載の医
薬、
- 25 (6) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
アミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対
する抗体、
- (7) 上記(6)記載の抗体を含有してなる医薬、
- (8) 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤である上記(7)記載の医

薬、

(9) 上記(6)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(10) 神経変性疾患または糖尿病の診断薬である上記(9)記載の診断薬、

5 (11) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる神経変性疾患または糖尿病の診断薬、

(12) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたは
10 その塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(13) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

15 (14) 上記(12)記載のスクリーニング方法または上記(13)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩、

(15) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を阻
20 害する化合物またその塩のスクリーニング方法、

(16) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またその塩のスクリーニング用キット、

25 (17) 上記(15)記載のスクリーニング方法または上記(16)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またその塩、

(18) 上記(14)または(17)記載の化合物またその塩を含有してなる医薬、

(19) 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤である上記(18)記載

の医薬、

(20) 哺乳動物に対して、上記(14)または(17)記載の化合物またその塩の有効量を投与することを特徴とする神経変性疾患または糖尿病の予防・治療法、

- 5 (21) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの活性を阻害する、または上記タンパク質遺伝子の発現を阻害することを特徴とする神経変性疾患または糖尿病の予防・治療法、

- (22) 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤を製造するための上記
10 (14) または(17)記載の化合物またその塩の使用、

(23) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤、

- 15 (24) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤、

- (25) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
20 のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(26) 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤である上記(25)記載の医薬、

- (27) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
25 のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(28) 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤である上記(27)記載の医薬、

(29) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一

のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌またはリウマチ性疾患の診断薬、

5 (30) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 (31) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(32) 上記(30)記載のスクリーニング方法または上記(31)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩、

15 (33) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またその塩のスクリーニング方法、

20 (34) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またその塩のスクリーニング用キット、

(35) 上記(33)記載のスクリーニング方法または上記(34)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またその塩、

(36) 上記(32)または(35)記載の化合物またその塩を含有してなる医薬、

25 (37) 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤である上記(36)記載の医薬、

(38) 哺乳動物に対して、上記(32)または(35)記載の化合物またその塩の有効量を投与することを特徴とする癌またはリウマチ性疾患の予防・治療法、

(39) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの活性を促進する、または上記タンパク質遺伝子の発現を促進することを特徴とする癌またはリウマチ性疾患の予防・治療法、

- 5 (40) 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤を製造するための上記(32)または(35)記載の化合物またその塩の使用などを提供する。

図面の簡単な説明

図1は、ツニカマイシン刺激24時間後における細胞のDNA切断量をOD405-492
10 で表す図である。図中、縦軸は吸光度を、横軸はツニカマイシンの濃度を示す。
—○—は対照細胞におけるDNA切断量を、—□—はNIPK遺伝子形質導入細胞にお
けるDNA切断量を示す。

図2は、ツニカマイシン刺激48時間後における細胞のDNA切断量をOD405-492
15 で表す図である。図中、縦軸は吸光度を、横軸はツニカマイシンの濃度を示す。
—○—は対照細胞におけるDNA切断量を、—□—はNIPK遺伝子形質導入細胞にお
けるDNA切断量を示す。

図3は、タブシガーギン刺激24時間後における細胞のDNA切断量をOD405-492
20 で表す図である。図中、縦軸は吸光度を、横軸はタブシガーギンの濃度を示す。
—○—は対照細胞におけるDNA切断量を、—□—はNIPK遺伝子形質導入細胞にお
けるDNA切断量を示す。

図4は、タブシガーギン刺激48時間後における細胞のDNA切断量をOD405-492
25 で表す図である。図中、縦軸は吸光度を、横軸はタブシガーギンの濃度を示す。
—○—は対照細胞におけるDNA切断量を、—□—はNIPK遺伝子形質導入細胞にお
けるDNA切断量を示す。

図5は、タブシガーギン刺激48時間後における細胞の呼吸活性をOD450で表す
図である。図中、縦軸は吸光度を、横軸には導入遺伝子を示す。

図6は、抗V5抗体で免疫沈降法後、NIPKとAkt1との結合を抗Akt1抗体を用い
てウエスタンブロッティングにより検出した図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用いて計算することができる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸

配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。具体的には、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18または配列番号：20で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが挙げられる。

- 5 実質的に同質の活性としては、例えば、神経原線維変化促進活性、神経細胞死促進活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、上記活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、
- 10 タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

神経原線維変化促進活性の測定は、例えば、本発明のタンパク質の発現ベクターを細胞に導入後、免疫染色法（例、抗タウ抗体などを使用）により神経線維を染色し、その染色像を顕微鏡により取得し、神経線維の変化の程度を測ることにより、測定できる。

- 15 神経細胞死促進活性の測定は、例えば、本発明のタンパク質の発現ベクターを細胞に導入し、細胞死誘導剤（例、ツニカマイシン、タプシガーギン、2-デオキシグルコース、 β アミロイド、オカダ酸、ホモシステインなど）を添加した後、カルセイン染色を用いた軸索の変性量、ミトコンドリアの呼吸活性、培養上清中のLDH（lactate dehydrogenase）量、または細胞死に伴うDNA切断量な
- 20 どを測ることにより、測定できる。

- また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、（1）（i）配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ii）配列番号：1
- 25 で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（iii）配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）

個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)配列番号:1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1~100個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホ

ルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

5 本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

10 具体的には、後述する本発明の抗体を調製する目的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において第1～30番目、第250～280番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

15 また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2
20 個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されて
25 いてもよい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-COOH$ ）、カルボキシレート（ $-COO^-$ ）、アミド（ $-CONH_2$ ）またはエステル（ $-COOR$ ）の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられ

るタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換
5 基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的
10 に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マ
15 レイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタン
スルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、
前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法
によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する
形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の
20 ペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織
または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相ク
ロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー
を組み合わせることにより精製単離することができる。

25 本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または
そのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることがで
きる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチ
ル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシ
ベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、

- 4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリル
アミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノ
キシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェ
ノキシ樹脂などを挙げるができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基
5 と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通り
に、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂
からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、
さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタン
パク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。
- 10 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種
活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボ
ジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-
エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられ
る。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOO
15 Bt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物ま
たはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミ
ノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。
- 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク
質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例え
20 ば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メ
チルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲ
ン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスル
ホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン
などのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢
25 酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが
用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られ
ている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択さ
れる。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニン
ヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を

行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

- 5 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。
- 10 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベン
- 15 ジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

- セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ C_{1-6} ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジル
- 20 オキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

- チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。
- 25

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無

水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質また

は部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(i)～(v)に記載された方法が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966年)

(ii) SchroederおよびLuebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用い

られる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

- 5 本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいづれでもよい。

- 10 ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

- 15 本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

- 20 配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。具体的には、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17または配列番号：19で表される塩基配列を含有するDNAなどが挙げられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=0N; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

- 5 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。
- 10 ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

- 15 より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 20 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド (例、DNA) としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

- 25 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNAの一部を有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と

同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

5 本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードする DNA のクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成 DNA プライマーを用いて PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

10 DNA の塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

20 クローン化されたタンパク質をコードする DNA は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該 DNA はその 5' 末端側に翻訳開始コドンとしての ATG を有し、また 3' 末端側には翻訳終止コドンとしての TAA、TGA または TAG を有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成 DNA アダプターを用いて付加することもできる。

25 本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードする DNA から目的とする DNA 断片を切り出し、（ロ）該 DNA 断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて

d h f r 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質の N 端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

10 このようにして構築された本発明のタンパク質をコードする DNA を含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60 巻, 160 (1968)] , JM103 [Nucleic Acids Research, 9 巻, 309 (1981)] , JA221 [Journal of Molecular Biology, 120 巻, 517 (1978)] , HB101 [Journal of Molecular Biology, 41 巻, 459 (1969)] , C600 [Genetics, 39 巻, 440 (1954)] などが用いられる。

20 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [Gene, 24 巻, 255 (1983)] , 207-21 [Journal of Biochemistry, 95 巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスイエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが AcNPV の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf 細胞)、Trichoplusia ni の

中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Ver o, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, マウスATDC5細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110 (1972) や Gene, 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培

養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、

5 ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), Journal of Experiments in

10 Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

15

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地

20

〔Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330 (1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、

25

Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約

5 ～ 20 % の胎児牛血清を含む MEM 培地 [Science, 122 巻, 501 (1952)] , DMEM 培地 [Virology, 8 巻, 396 (1959)] , RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association 199 巻, 519 (1967)] , 199 培地

[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73 巻, 1 (1950)]

5 などが用いられる。pH は約 6 ～ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃ ～ 40℃ で約 15 ～ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

10 上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適
15 宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100TM などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質
20 の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグ
25 ラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られ

た場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

5 なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリ
10 コシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。
10 る。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってよい。

15 本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

20 （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行
25 われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾

- 臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の
- 5 標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。
- 10 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは3
- 15 0~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放
- 20 射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合
- 25 したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても

良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

10 モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、
25 キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いること

ができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

- 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、
- 5 完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

- 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定
- 10 と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、
- 15 これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであって
- 20 もよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

- 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが
- 25 挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリ

ヌクレオチドが、(ロ) RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド）などが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチドを、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発

- 明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・
- 5 制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。
- 10 目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、
- 15 該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内
- 20
- 25

ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T.

Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993
などに開示がある。

5 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、
結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で
供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられる
ことができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格
の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との
相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホス
10 ホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加す
るに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステ
リルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸
の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド
結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あ
るいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、R
15 N a s eなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。
こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレン
グリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護
基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生
20 体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系
を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用
できる。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本
25 発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペ
プチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、本発明のDNAと
略記する場合がある））、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそ
の塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発
明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポ

リヌクレオチドと略記する場合がある)の用途を説明する。

本発明のタンパク質は、小胞体ストレスを伴う神経細胞死により発現が上昇し、小胞体ストレス依存性の細胞死を促進する。また、本発明のタンパク質は、
5 細胞死（神経細胞死）および神経原線維変化を促進する。さらに、本発明のタンパク質は、Akt1と結合し、Akt1活性を阻害する。よって、本発明のタンパク質は、神経変性、糖尿病、癌、リウマチ性疾患などにおける早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬は、例えば、神経変性疾患、糖尿病およびその合併症などの安全な予防・治療剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質、および本発明のDNAなどは、例えば癌、リウマチ性疾患などの安全な予防・治療剤として使用することができる。

(1) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

20 本発明のタンパク質は小胞体ストレスを伴う神経細胞死により発現が上昇し、小胞体ストレス依存性の細胞死を促進する。また、本発明のタンパク質は、神経細胞の生存維持およびタウのリン酸化に重要な役割を果たしているIGF-1/インスリンシグナルを調節する主要な分子であるAkt1と結合し、Akt1活性を阻害することにより、タウの高リン酸化が起こる。これより、本発明のタンパク質
25 は、神経原線維変化促進活性、神経細胞死促進活性などを有する。

よって、本発明のタンパク質の活性を調節（阻害または促進、好ましくは阻害）する化合物またはその塩は、例えば、神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、

クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤として安全に使用することができる。

- 5 一方、多くの癌では、DNA変異によりPTEN（Akt1を不活性化している癌抑制遺伝子の一つ）の機能が欠失し、Akt1が恒常的に活性化しており、これが細胞の癌化と悪性化に重要な役割を果たしている。また、リウマチ患者の滑膜細胞ではAkt1活性が亢進しており、かつ、Akt1の機能を抑制することによりアポトーシスを誘導できることから、Akt1の活性化が滑膜細胞の増殖を伴うリウマチ性疾患の病態形成に重要な役割を果たしている。
- 10

よって、本発明のタンパク質の活性を調節（阻害または促進、好ましくは促進）する化合物またはその塩は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、血液腫瘍など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）などの安全な予防・治療剤として使用することができる。

15

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を調節（阻害または促進）する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

- 20 すなわち、本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性を調節（阻害または促進）する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 例えば、(i) 本発明のタンパク質の活性（神経原線維変化促進活性、神経細胞死促進活性など）と、(ii) 本発明のタンパク質と試験化合物の混合物の活性との比較をすることにより、本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングする。
- 25

具体的には、例えば、(i') 本発明のタンパク質発現ベクターを細胞に導入し、培養した場合、および(ii') 本発明のタンパク質発現ベクターを細胞に導入し、試験化合物存在下、培養した場合において、免疫染色法（例、抗タウ抗

体などを使用)により神経線維を染色し、その染色像を顕微鏡により取得し、神経線維の変化の程度をそれぞれ測ることにより神経原線維変化促進活性を測定し、比較し、本発明のタンパク質の活性を調節(促進または阻害)する化合物またはその塩をスクリーニングする。

- 5 具体的には、例えば、(i'') 本発明のタンパク質発現ベクターを細胞に導入し、培養した場合、および(ii'') 本発明のタンパク質発現ベクターを細胞に導入し、試験化合物存在下、培養した場合において、細胞死誘導剤(例、ツニカマイシン、タブシガーギン、2-デオキシグルコース、 β アミロイド、オカダ酸、ホモシステインなど)を添加し、カルセイン染色を用いた軸索の変性量、
- 10 ミトコンドリアの呼吸活性、培養上清中のLDH (lactate dehydrogenase) 量、または細胞死に伴うDNA切断量などを測ることにより神経細胞死促進活性を測定、比較し、本発明のタンパク質の活性を調節(促進または阻害)する化合物またはその塩をスクリーニングする。

- また、Akt1は、Cot (甲状腺癌細胞株から発見された癌遺伝子で、mitogen-activated protein kinase kinase kinaseファミリーの一つである) およびIKK (NF- κ BのインヒビターであるI κ Bをリン酸化することにより、NF- κ Bの転写を活性化するキナーゼである)の活性化を介してNF- κ Bの転写活性化を誘導する (Mol. Cell. Biol., 22巻、5962-5974項、2002年)。
- 15 これより、以下のスクリーニング方法も用いられる。

- 20 (i''') 本発明のタンパク質発現ベクターを、NF κ Bの結合配列をプロモーターまたはエンハンサー中に含有するレポーター遺伝子とともに細胞に導入し、必要に応じ、(a) 微生物細胞破碎液、微生物培養上清、真核細胞破碎液、真核細胞培養上清などリガンドが含まれる液、(b) リガンド自身または(c) 天然のリガンドと同等に結合活性を有する物質を添加して培養した場合と、
- 25 (ii''') 本発明のタンパク質発現ベクターを、NF κ Bの結合配列をプロモーターまたはエンハンサー中に含有するレポーター遺伝子とともに細胞に導入し、必要に応じ、(a) 微生物細胞破碎液、微生物培養上清、真核細胞破碎液、真核細胞培養上清などリガンドが含まれる液、(b) リガンド自身または(c) 天然のリガンドと同等に結合活性を有する物質を添加して、試験化合物の存在下、

培養した場合の、レポーター発現量を測定し、比較し、本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングする。

レポーター発現量は、ルシフェラーゼ活性、アルカリフォスファターゼ活性などを用いたレポータータンパク質活性を指標とすることにより測定できる。

- 5 上記の本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養することによって製造されたものなどが用いられる。さらには、前記細胞の培養液、その上清、細胞破碎物などを用いてもよい。

- 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS 7細胞、CHO細胞、HEK 293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞外に分泌させる、または細胞内に発現させる形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した
- 10 本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

- 例えば、上記(ii)、(ii')、(ii'')および(ii''')の場合における活性が上記(i)、(i')、(i'')および(i''')の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少する試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として、上記(ii)、(ii')、(ii'')および(ii''')の場合における活性が上記(i)、(i')、(i'')および(i''')の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上増加する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物として選択することができる。
- 20 25

本発明のタンパク質の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するため、安全で低毒性な、例えば、神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、

孤発性アルツハイマー病など)、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など)、糖尿病およびその合併症(例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など)などの予防・治療剤として有用である。

本発明のタンパク質の活性を促進する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の作用を増強するため、安全で低毒性な、例えば、癌(例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、血液腫瘍など)、リウマチ性疾患(例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など)などの予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

上記した本発明のタンパク質の作用に加え、本発明のタンパク質をコードする遺伝子も、小胞体ストレスを伴う神経細胞死誘導により発現が増加することにより、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節(好ましくは阻害)する化合物またはその塩は、例えば、神経変性疾患、糖尿病およびその合併症などの予防・治療剤として、また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節(好ましくは促進)する化合物またはその塩は、例えば、癌、リウマチ性疾患などの予防・治療剤として使用することができる。

したがって、本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節(阻害または促進)する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

スクリーニング方法としては、(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うこと

を特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

上記方法において、(iii) と (iv) の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードする mRNA 量）を測定して、比較する。

- 5 試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA 法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

mRNA 量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：2 またはその一部分を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：2 またはその一部分を含有する核酸を用いる PCR 法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- 15 例えば、上記 (iv) の場合における遺伝子発現量を、上記 (iii) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上減少させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害する化合物として、上記 (iv) の場合における遺伝子発現量を、上記 (iii) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上増加させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

- 25 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩は、例えば、神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤として使用することができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節（好ましくは促進）する化合物またはその塩は、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、血液腫瘍など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）などの予防・治療剤として使用することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは

油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50
5 (polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用い
10 られる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示さ
15 れ、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では 5～100mg、その他の剤形では 10～250mg の上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

20 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、アルツハイマー病の治療の目的で、本発明のタンパク質の活性または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物
25 またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1～100mg、好ましくは約 1.0～50mg、より好ましくは約 1.0～20mg 投与する。非経口的

に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、アルツハイマー病の治療の目的で、本発明のタンパク質の活性または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

例えば、慢性関節リウマチの治療の目的で、本発明のタンパク質の活性または該タンパク質の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチの治療の目的で、本発明のタンパク質の活性または該タンパク質の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを関節内注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（2）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測

定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' あるいは Fab 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン

系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１

抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加または減少が検出された場合、例えば、神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などである、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

（３）遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874～879頁（1989年）、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施すること

ができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多または減少が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などである可能性が高いと診断することができる。

（４）アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば、神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤として使用することができる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチ

センスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

- 5 さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポゾームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下、病変部等に投与してもよい。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、アルツハイマー病の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約 0.1 ～ 100 mg 投与する。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明の DNA の存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードする RNA の一部を含有する二重鎖 RNA、本発明のタンパク質をコードする RNA の一部を含有するリボザイムなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられる DNA の機能を抑制することができるので、例えば、神経変性疾患

〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。

二重鎖 RNA は、公知の方法（例、Nature, 411 巻, 494 頁, 2001 年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221
頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造
することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に
公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタ
5 ンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断
され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げら
れる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場
合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することがで
10 きる。

（５）本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば
神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アル
15 ツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、
筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチント
ン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその
合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿
病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤として
20 使用することができる。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することがで
きる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的
に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成
物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤
形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒
剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁
剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野
において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。

例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、
5 プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene(50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアン
10 プルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では
20 5～100mg、その他の剤形では 10～250mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

25 本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、静脈投与）に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の

アルツハイマー病の治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、注射剤として投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

また、本発明の抗体は、例えば、神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの診断薬としても有用である。

15 (6) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 20 (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

25 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェク

5 ション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

10 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

15 哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

20 本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

25 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する

各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳がんウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンI I、ウロプラキンI I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK 1, K 1 0およびK 1 4、コラーゲンI型およびI I型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にT i e 2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびI I A、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2 L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タ

ンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部(VN P)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α)のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動

物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

- 5 本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

10 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

- 15 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

20 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

25 また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発

性硬化症など）、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活

性型不応症に対する予防・治療剤、例えば神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、
5 多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記２種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- 10 (i) 組織培養のための細胞源としての使用、
(ii) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
- 15 (iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
(iv) 上記 (iii) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
(v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。
- 20 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。
- 25 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなど

ができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性化型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

10 (7) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 15 (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- 20 (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- 25 (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、
5 免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫で
10 あるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効
15 率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。
20
25

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、

ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。

- 5 例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-10000$ U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常
- 10 0.001~0.5%トリプシン/0.1~5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

- ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または
- 15 細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87
- 20 巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別
- 25 することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDN

A配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをロックアウトさせることができる。

5 本発明のDNAがロックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

15 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

20 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になる
- 5 ような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

- 10 また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

- 15 (7 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- 20 すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、
- 25 クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

10 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

15 例えば神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などに対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と神経細胞死数の違い、種々のタンパク質量の違いなどを上記組織で経時的に観察する。

25 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起

こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 5 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、
- 10 ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 15 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）のアルツハイマー病患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）のアルツハイマー病患者に投与する場合、
- 20 一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。
- 25

(7 b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対する
5 プロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター
10 遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはル
15 シフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼ
20 の基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM

EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した
5 試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付
10 加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

15 本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の調節、該タンパク質の機能を調節することができるので、例えば神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化
20 症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。
25

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトま

たは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）のアルツハイマー病患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）のアルツハイマー病患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

（８）本発明のタンパク質が関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明のタンパク質は、Akt1と結合し、Akt1活性を阻害する。

したがって、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質の発現量が減少している場合には、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、
5 卵巣癌、血液腫瘍など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）などの種々の疾患が発症する。

よって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、血液腫瘍な
10 ど）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）などの予防・治療剤として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、本発明のタンパク質の活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、
15 本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

20 本発明のDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認めら
25 れる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ペヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、

酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

- 5 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

- 10 本発明のタンパク質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のタンパク質を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例え
- 15 ば、慢性関節リウマチの治療目的で本発明のタンパク質を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

20

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

- 25 DNA : デオキシリボ核酸
 cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
 A : アデニン
 T : チミン
 G : グアニン

	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
5	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
10	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
15	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
20	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
25	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン

G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

5 また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
10	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
15	C l ₂ -B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
20	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェニル
	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
25	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシー-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	H O N B	: 1-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

DCC : N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

- 5 ヒトNeuronal cell death inducible putative kinase (NIPK) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

ヒトNIPKをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

- 10 実施例3および実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

GenBank Accession No. NM021158の塩基配列を示す。

- 15 〔配列番号：6〕

配列番号：5で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

GenBank Accession No. NM021158の251番目のAがGに置換された塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

- 20 配列番号：7で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

GenBank Accession No. AAF30480の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

配列番号：9で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

- 25 〔配列番号：11〕

GenBank Accession No. AAH76218の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

配列番号：11で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕

GenBank Accession No. AAI58064の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

配列番号：13で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

- 5 GenBank Accession No. AAI59850の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

GenBank Accession No. AAS06709の塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：18〕

配列番号：17で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：19〕

GenBank Accession No. AF250311の塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

- 15 配列番号：19で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕

実施例4で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

実施例4で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：23〕

実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

- 25 実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

以下において、実施例により本発明をより具体的に示すが、この発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

小胞体ストレスで発現変動する遺伝子群を明らかにするため、以下のような実験を行った。

- タイプ I 型コラーゲンコート24穴プレート (SUMILON) にTP-17のCDラット (日本チャールズリバー) より調製したラット初代神経細胞をB27含Neurobasal 5 培地 (NB培地: GIBCO) に懸濁した後、25万個/wellで播種し3日間培養した。
- (i) 上記培養細胞に最終濃度100nMとなるようツニカマイシン (Tnc) を添加し、
(ii) 上記培養細胞に最終濃度2nMとなるようタブシガーギン (Thap) を添加し、
または (iii) 上記培養細胞を、グルコースを含まないB27含DMEM培地で2回培地
交換した後、3mMとなるよう2-デオキシグルコース (2DG) を添加し、それぞれ4、
10 8および24時間後に細胞よりRNeasy Mini kit (キアゲン) を用いて実験手引き
書に従いtotal RNAを抽出した。対照として上記薬剤 (Tnc、Thapおよび2DG) の
代わりに、各培地を添加した細胞 (薬剤非添加細胞) を用いた。これらを材料
としてoligonucleotide microarray (Rat Genome U34A; Affymetrix社) を用い
て遺伝子発現解析を行った。
- 15 実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書 (Expression analysis technical
manual) に従った。各薬剤で刺激した細胞と非添加の細胞の遺伝子発現profile
を比較した結果、Neuronal cell death inducible putative kinase (NIPK) 遺
伝子が、各小胞体ストレス刺激 [上記 (i)、(ii) および (iii)] により発
現亢進していた (表1)。

〔表 1〕

	細胞	遺伝子発現量 ^a
	Tnc 刺激 4 時間後	0.41
	非刺激 4 時間後	ND
5	Tnc 刺激 8 時間後	1.64
	非刺激 8 時間後	ND
	Tnc 24 時間後	1.32
	非刺激 24 時間後	ND
	Thap 刺激 4 時間後	0.93
10	非刺激 4 時間後	ND
	Thap 8 時間後	2.70
	非刺激 4 時間後	ND
	Thap 刺激 24 時間後	1.64
	非刺激 24 時間後	ND
15	2DG 添加 4 時間後	0.72
	非刺激 4 時間後	ND
	2DG 添加 8 時間後	1.79
	非刺激 8 時間後	ND
	2DG 添加 24 時間後	2.45
20	非刺激 24 時間後	ND

^a 遺伝子発現量は、oligonucleotide microarray で発現が検出された presence を示す遺伝子の発現量の中央値を 1 として標準化した。

ND; not detected

25 実施例 2

小胞体ストレスにより発現亢進したNIPK遺伝子の発現にβアミロイド刺激が影響を与えるか否かを検討する目的で、βアミロイドで刺激した細胞を用いて実施例 1 と同様に遺伝子発現解析を行なった。

実施例 1 と同様に調製したラット初代神経細胞をN2含DMEM培地（GIBCO）に懸

- 濁した後、25万個/wellで播種し4日間培養した。培養後、最終濃度25 μ Mとなるよう上記培地で懸濁した β アミロイドを添加し、4、8、24時間後に実施例1と同様に、細胞よりtotal RNAを抽出し、遺伝子解析を行なった。対照には β アミロイドの代わりに上記培地を添加した細胞を用いた。対照と比較して、 β アミロイドで刺激した細胞でNIPKの発現が亢進していた（表2）。

〔表2〕

細胞	遺伝子発現量 ^a
β アミロイド刺激4時間後	ND
10 非刺激4時間後	ND
β アミロイド刺激8時間後	ND
非刺激8時間後	ND
β アミロイド刺激24時間後	0.34
非刺激24時間後	ND

- 15 ^a遺伝子発現量は、oligonucleotide microarrayで発現が検出された presence を示す遺伝子の発現量の中央値を1として標準化した。

実施例3

- 20 NIPKが細胞死に与える影響を検討する目的で、一過性形質導入を用いてNIPK 遺伝子発現細胞を作製し、細胞死誘導系に供した。

- ヒト神経芽細胞腫SK-N-AS細胞（ATCCより購入）に最終濃度500nMとなるようタブシガーギンを添加し8時間培養した。培養後、ISOGEN（ニッポンジーン）を用いてtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAを鋳型としてRNA PCR kit（TAKARA）を用いて逆転写反応を行なった。ヒトNIPK遺伝子の増幅のため、合成プライマー（配列番号：3および配列番号：4）と、酵素としてPfu turbo（ストラタジーン）を用い、以下の（1）～（5）の条件でPCRを行ない、特異的なPCR産物を得た。

（1）95℃ 1分

（2）95℃ 20秒－68℃ 15秒－72℃ 1分を3回

- (3) 95℃ 20秒－66℃ 15秒－72℃ 1分を3回
- (4) 95℃ 20秒－64℃ 15秒－72℃ 1分を35回
- (5) 72℃ 5分

5 得られたPCR産物を、pCDNA3.1-/V5-His TOP0 (インビトロジェン) ヘクローニングし、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたコロニーをLB培地で培養し、QUAGEN plasmid midi kit (キアゲン) を用いてベクターを回収した。このNIPK遺伝子発現ベクターをNucleofector (AMAXA) を用い、SK-N-AS細胞へ形質導入した。対照としてpCDNA3.1 (インビトロジェン) をSK-N-AS細胞へ形質導入した。

10 各形質導入細胞をタイプ I コラーゲンコート96穴プレート (IWAKI) へ7500個／ウェルで播種し、1晩培養後、ツニカマイシンまたはタプシガーギンを種々の濃度で添加し、1日または2日間培養し細胞死を誘導した。培養後、細胞死に伴うDNA切断を、CELL DEATH DETECTION ELISA ^{PLUS} kit (ロッシュ) を用い検出した。実験方法は、キットに添付された実験手引き書に従った。

結果を図1～図4に示す。

15 pCDNA3.1形質導入SK-N-AS細胞 (対照細胞) と比較して、ヒトNIPK遺伝子形質導入細胞ではDNA切断が亢進した。これより、NIPKが細胞死促進作用を有することが明らかである。

実施例 4

20 NIPKが細胞死に与える影響を検討することを目的として、レンチウイルスを用いてラットNIPK遺伝子発現細胞を作製し、細胞死誘導系に供した。

ラット海馬神経細胞に最終濃度100 nMとなるようツニカマイシンを添加し8時間培養した。培養後、細胞よりRNeasy Mini kit (キアゲン) を用いてtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAを鋳型としてRNA PCR kit (TAKARA) を用いて逆転写反応を行なった。ラットNIPK遺伝子の増幅のため、合成プライマー (配列番号：21および配列番号：22) と、酵素としてPfu turbo (ストラタジーン) を用い、以下の(1)～(3)の条件でPCRを行い、特異的なPCR産物を得た。

- (1) 94℃ 1分

(2) 94℃ 30秒－65℃ 30秒－72℃ 30秒を25回

(3) 72℃ 5分

得られたPCR産物を、viraPower Lentiviral Directional TOP0 Expression Kit (INVITROGEN)を用いてpLenti6/V5-TOP0ベクターにクローニングし、大腸菌
5 DH5 α を形質転換した。得られたコロニーをLB培地で培養し、QIAGEN endofree maxi kit (キアゲン)を用いてベクターを回収した。作製したNIPKレンチウイルスベクター、またはLacZレンチウイルスベクターとpackaging Mixを Nucleofector (AMAXA)を用い、同時にHEK293FT細胞(インビトロジェン)に導入した。24時間後に培地を交換し、導入から48および72時間後に培養上清を回収した。回収した培養上清を40000xgで4時間遠心し、沈殿を1/100量のニューロ
10 ベイサル培地で溶解させ、4℃で一晩放置した後、37℃に加温して使用した。

SD-IGSラット(日本チャールズリバーから購入)のTP17の胎児を使用し、定法に従い海馬神経細胞を単離し、ポリLリジンコート24穴プレート(SUMILON)へ25万個/ウェルで播種した。培養4日後にレンチウイルス(培養上清50 ml相当)を含む培地500 μ lを添加し、24時間後に3 nMのタプシガーギンを含む培地で全量交換を行なった。培養2日後にWST-8を培地の1/10量加え、37℃で90分培養した後培地を200 μ l回収し、450 nmの吸光度を測定した。

結果を図5に示す。

LacZ形質導入ラット神経細胞(対照細胞)と比較して、ラットNIPK遺伝子形質導入細胞ではミトコンドリア呼吸活性の低下が見られた。これより、NIPKが
20 細胞死促進作用を有することが明らかである。

実施例 5

NIPKとAkt1の結合を確認することを目的として以下の実験を行なった。

pCDNA3.1-/V5-His TOP0 (インビトロジェン)ベクターにクローニングしたヒトNIPK(実施例3)を鋳型とし、合成プライマー(配列番号: 3および配列番号: 23)と、酵素としてPfu turbo(ストラタジーン)を用い、以下の(1)～(3)の条件でPCRを行い、特異的なPCR産物を得た。

(1) 94℃ 5分

(2) 94℃ 30秒－60℃ 30秒－72℃ 1分を25回

(3) 72℃ 5分

得られたPCR産物を、pCDNA3.1-/V5-His TOP0 (インビトロジェン) ヘクロー
ニングし、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたコロニーをLB培地で培養し、
5 QIAGEN endofree maxi kit (キアゲン) を用いてV5タグ付きヒトNIPK遺伝子発
現ベクターを回収した。

Akt1遺伝子発現ベクターは以下の方法で作製した。Quick-clone human whole
brain cDNA (クロンテック) を鋳型とし、合成プライマー (配列番号: 24お
よび配列番号: 25) と酵素としてPfu turbo (ストラタジーン) を用い、以下
10 の (1) ~ (3) の条件でPCRを行った。

(1) 94℃ 5分

(2) 94℃ 30秒－58℃ 30秒－72℃ 2分を35回

(3) 72℃ 5分

得られたPCR産物2 μ lを鋳型とし、同様の合成プライマーと酵素を用い、以下
15 の (1) ~ (3) の条件でPCRを行い、特異的なPCR産物を得た。

(1) 94℃ 5分

(2) 94℃ 30秒－58℃ 30秒－72℃ 2分を20回

(3) 72℃ 5分

得られたPCR産物を、pCDNA3.1-/V5-His TOP0 (インビトロジェン) ヘクロー
20 ニングし、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたコロニーをLB培地で培養し、
QIAGEN endofree maxi kit (キアゲン) を用いてベクターを回収した。

上記で得られたV5タグ付きヒトNIPK遺伝子発現ベクターおよびAkt1遺伝子発
現ベクターを、Nucleofector (AMAXA) を用いて同時にCOS7細胞に導入した。こ
の細胞をタイプIコラーゲンコート10 cmシャーレに400万個/シャーレで細胞を
25 播種し、37℃で18時間培養した。培地を除去し細胞を回収した後、lysis
buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、0.5 % NonidetP-40、1 mM
 β -mercaptoethanol、protease inhibitor cocktail (ROCHE)] で懸濁し、ホ
モジナイザーにより細胞を破碎した。遠心により回収した上清にrec-protein G
sepharose 4B (ZYMED) を添加し、4℃で2時間反応した後、上清を回収し、rec-

protein G sepharose 4B、抗V5抗体（INVITROGEN）を加え、4℃で18時間回転させながら反応した。1 mlのlysis bufferで4回洗浄後、電気泳動を行い、抗Akt1抗体（SANTA CRUZ）を用いてウエスタンブロッティングを行なった。

結果を図6に示す。

- 5 V5タグ付きNIPKとAkt1を同時に発現させた場合Akt1が検出されるのに対して、GFP（和光純薬）とAkt1を同時に発現させた場合（対照群）にはAkt1は検出されなかった。これより、NIPKとAkt1が細胞内で結合することが確認された。NIPKとAkt1との結合は、Akt1の活性低下を惹起し、Akt1による神経細胞保護作用の抑制を介した神経細胞死を促進することが示唆される。したがって、NIPKを阻
- 10 害することにより、神経変性疾患の治療が期待できる。

産業上の利用可能性

- 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タン
- 15 ク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質に対する抗体、該遺伝子のアンチセンスポリポリヌクレオチドなどは、例えば神経変性疾患〔例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトーヤコブ病、ハンチントン舞踏病、
- 20 糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など〕、糖尿病およびその合併症（例、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、糖尿病性足病変、動脈硬化、高血圧症、高脂血症など）などの予防・治療剤として、また、該タンパク質の活性を促進する化合物またはその塩、該タンパク質の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、該タンパク質、該タンパク質をコードするポ
- 25 リヌクレオチドなどは、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、血液腫瘍など）、リウマチ性疾患（例、慢性関節リウマチ、変形関節症、痛風など）などの予防・治療剤として使用することができる。また、本発明の各種のポリヌクレオチドは、例えば上記疾患の診断

に有用である。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤。
- 5 2. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤。
- 10 3. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。
- 15 4. 請求項3記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
5. 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤である請求項4記載の医薬。
6. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
- 20 7. 請求項6記載の抗体を含有してなる医薬。
8. 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤である請求項7記載の医薬。
9. 請求項6記載の抗体を含有してなる診断薬。
10. 神経変性疾患または糖尿病の診断薬である請求項9記載の診断薬。
11. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる神経変性疾患または糖尿病の診断薬。
- 25 12. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそ

の塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 1 3. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

1 4. 請求項1 2記載のスクリーニング方法または請求項1 3記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩。

- 1 5. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またその塩のスクリーニング方法。

- 1 6. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またその塩のスクリーニング用キット。

1 7. 請求項1 5記載のスクリーニング方法または請求項1 6記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またその塩。

1 8. 請求項1 4または請求項1 7記載の化合物またその塩を含有してなる医薬。

- 1 9. 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤である請求項1 8記載の医薬。

2 0. 哺乳動物に対して、請求項1 4または請求項1 7記載の化合物またその塩の有効量を投与することを特徴とする神経変性疾患または糖尿病の予防・治療法。

- 2 1. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの活性を阻害する、または上記タンパク質遺伝子の発現を阻害することを特徴とする神経変性疾患または糖尿病の予防・治療法。

2 2. 神経変性疾患または糖尿病の予防・治療剤を製造するための請求項1

4 または請求項 17 記載の化合物またその塩の使用。

23. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる癌またはリウマチ性疾患の
5 予防・治療剤。

24. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤。

10 25. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

26. 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤である請求項 25 記載の医薬。

15 27. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

28. 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤である請求項 27 記載の医薬。

20 29. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる癌またはリウマチ性疾患の診断薬。

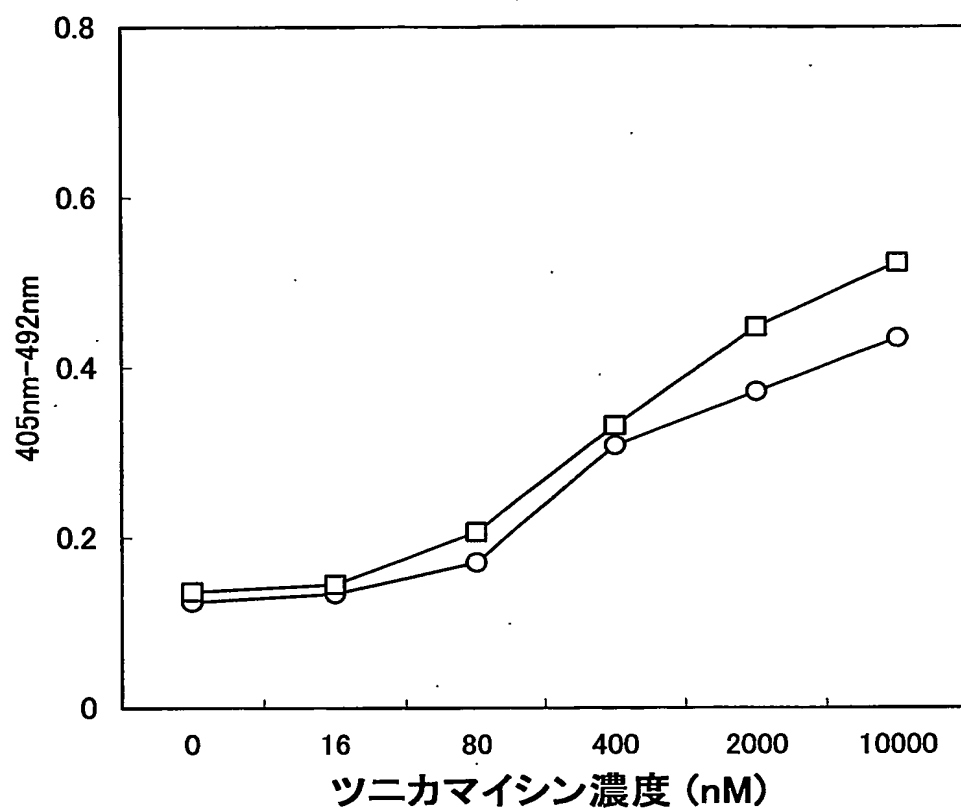
30. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

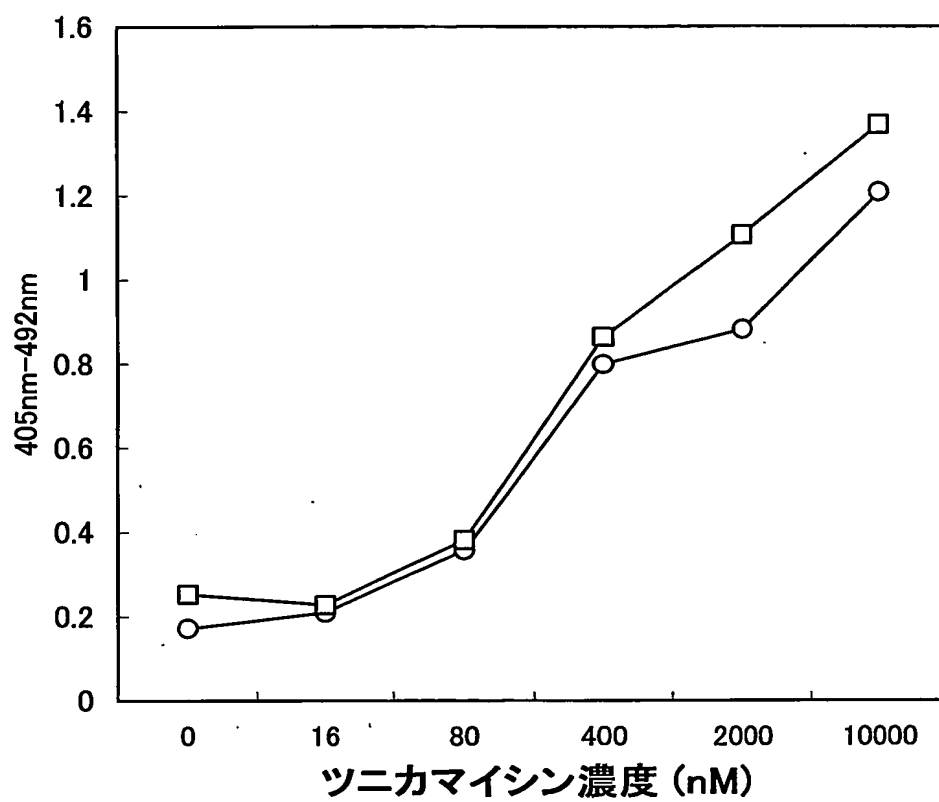
25 31. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

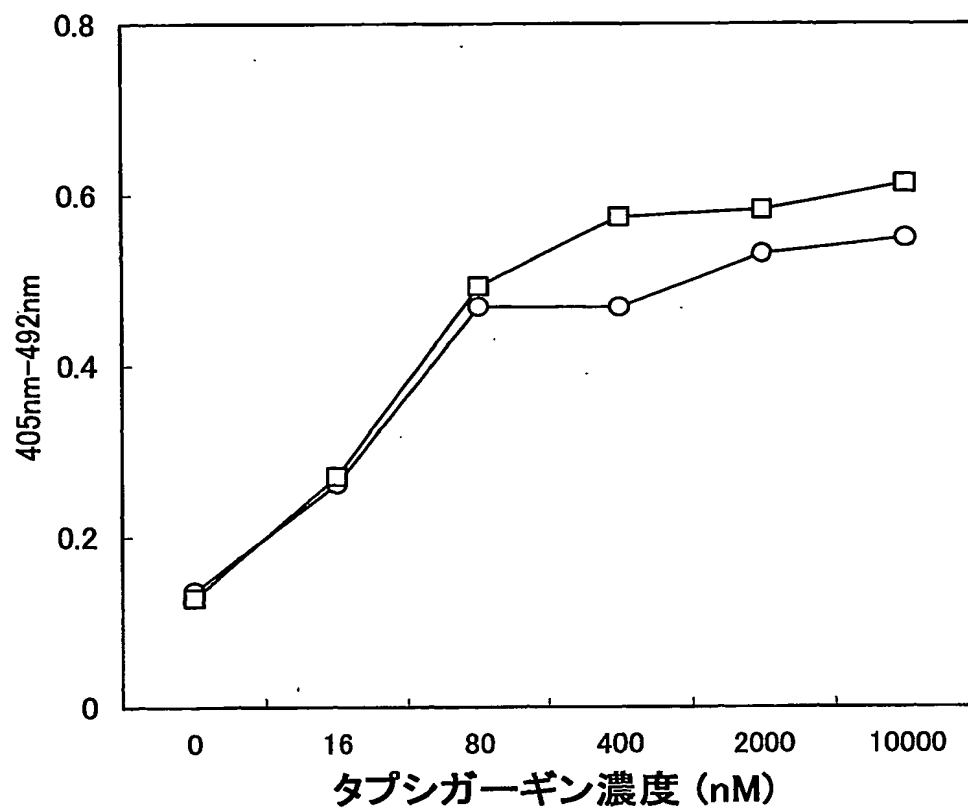
32. 請求項 30 記載のスクリーニング方法または請求項 31 記載のスクリ

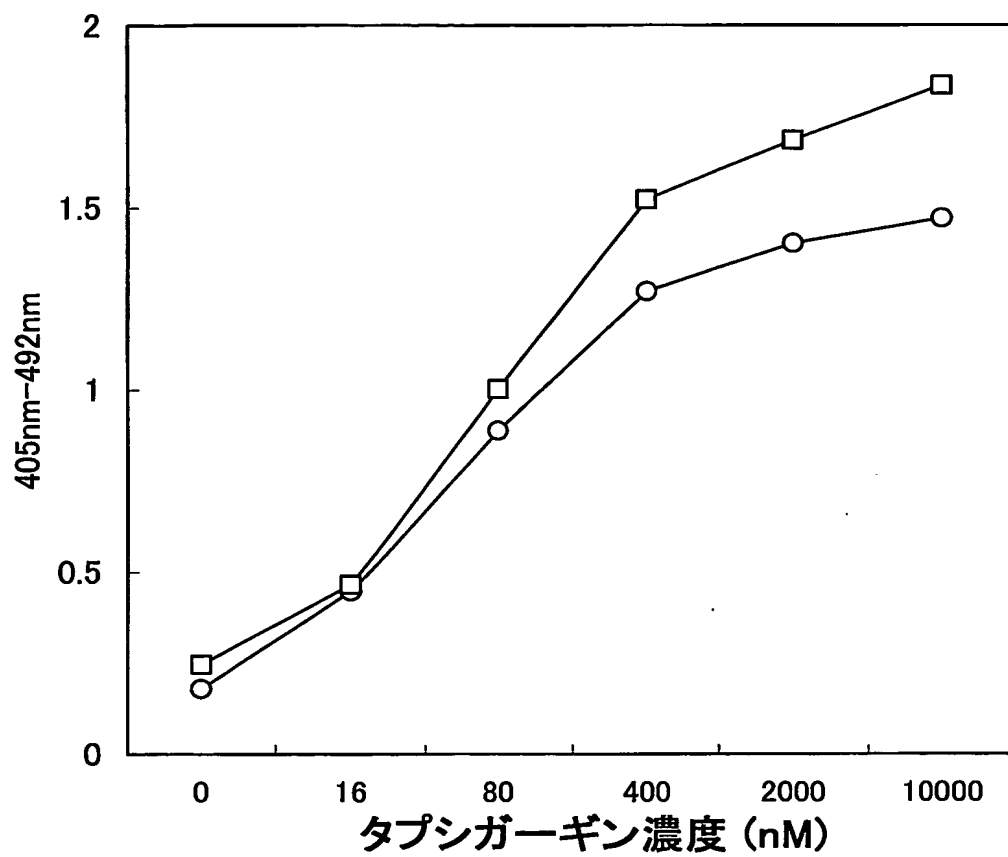
ーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩。

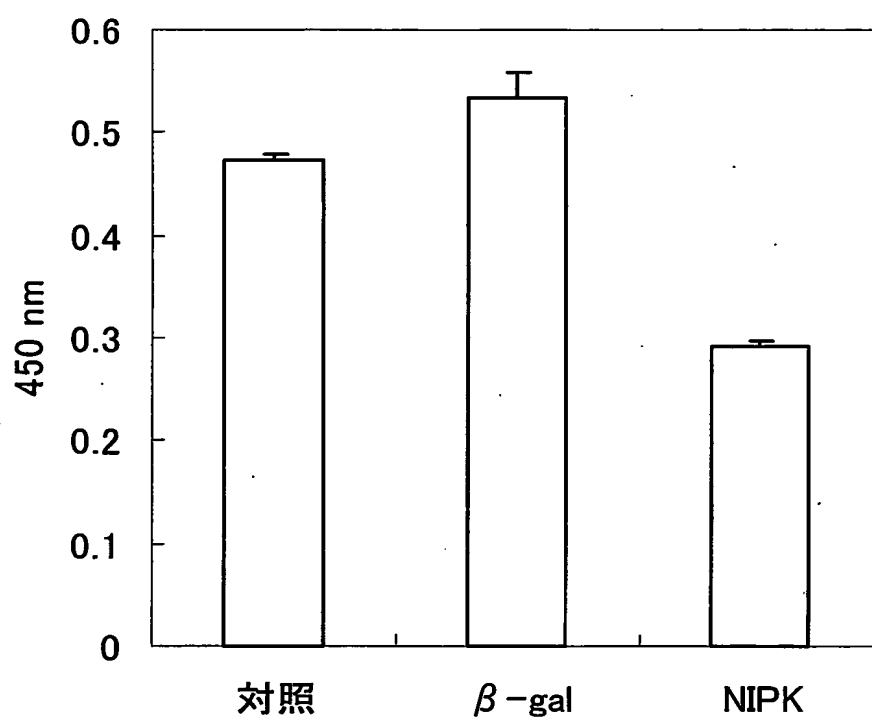
33. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またその塩のスクリーニング方法。
- 5 34. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、上記タンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またその塩のスクリーニング用キット。
- 10 35. 請求項33記載のスクリーニング方法または請求項34記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またその塩。
36. 請求項32または請求項35記載の化合物またその塩を含有してなる医薬。
37. 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤である請求項36記載の医薬。
- 15 38. 哺乳動物に対して、請求項32または請求項35記載の化合物またその塩の有効量を投与することを特徴とする癌またはリウマチ性疾患の予防・治療法。
39. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの活性を促進する、または上記タンパク質遺伝子の発現を促進することを特徴とする癌またはリウマチ性疾患の予防・治療法。
- 20 40. 癌またはリウマチ性疾患の予防・治療剤を製造するための請求項32または請求項35記載の化合物またその塩の使用。





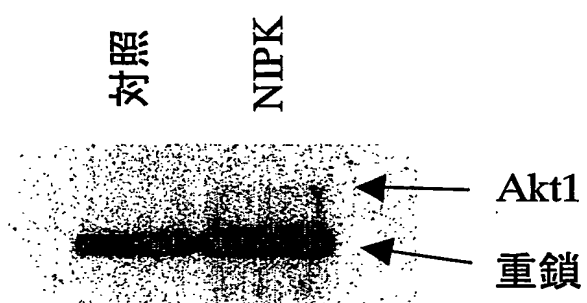






6/6

☒ 6



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Preventing and treating agent for neurodegenerative disease

<130> 3097W00P

<150> JP2002-26991

<151> 2002-9-13

<160> 25

<210> 1

<211> 358

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

35

40

45

Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr

50

55

60

Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys

85

90

95

Lys Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Leu Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala

100

105

110

Arg Leu Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala

115

120

125

Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met

130

135

140

His Ser Leu Val Arg Ser Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala

145

150

155

160

Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His

165

170

175

Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp

180

185

190

Arg Glu Arg Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val

195

200

205

Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala

210

215

220

Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys

225

230

235

240

Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala

245

250

255

Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys

260

265

270

Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala

275

280

285

Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu

290

295

300

Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met

305

310

315

320

Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val

325

330

335

Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg

340

345

350

Glu Val Val Leu Tyr Gly

355

<210> 2

<211> 1074

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```
atgcgagcca cccctctggc tgcctctgcg gggtccctgt ccaggaagaa gcggtiggag    60
ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag    120
cccagactgc ccccttgcc tttgccccctg agcccaccta ctgctccaga tcgtgcaact    180
gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggccc tatgtcctcc tggagcccga ggagggcggg    240
cgggcctacc aggccctgca ctgccctaca ggcactgagt atacctgcaa ggtgtacccc    300
gtccaggaag ccttggccgt gctggagccc tatgcgcggc tgcccccgca caagcatgtg    360
gctcggccca ctgaggctct ggctgggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc    420
catggggaca tgcacagcct ggtgcgaagc cgccaccgta tccctgagcc tgaggctgcc    480
gtgctcttcc gccagatggc caccgccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggctcctg    540
cgtgatctca agctgtgtcg ctttgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctggtgctg    600
gagaacctgg aggactcctg cgtgctgact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac    660
gcgtgcccag cctacgtggg acctgagata ctgagctcac gggccctcata ctggggcaag    720
gcagccgatg tctggagcct gggcgtggcg ctcttcacca tgctggccgg ccactacccc    780
ttccaggact cggagcctgt cctgctcttc ggcaagatcc gccgcggggc ctacgccctg    840
cctgcaggcc tctcggcccc tgcccgcgtg ctggttcgtt gcctccttcg tcgggagcca    900
gctgaacggc tcacagccac aggcatcctc ctgcaccctt ggctgcgaca ggacccgatg    960
cccttagccc caaccgatac ccatctcttg gaggtgtccc aggtgggtccc tgatggactg   1020
gggctggacg aagccaggga agaggaggga gacagagaag tggttctgta tggc          1074
```

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

gccatgagcag ccacccctct ggctgctcct gc

32

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

cctagccata cagaaccact tctctgtc

28

<210> 5

<211> 1074

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

atgagagcca cccctctagc tgctcctgcg ggttcctgt ccaggaagaa gcggttggag 60
ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag 120
cccagactgc cccctgcct gttgccccctg agccaccta ctgctccaga tcgtgcaact 180
gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggccc tatgtcctcc tggagcccga ggagggcggg 240
cgggcctacc aggccctgca ctgccctaca ggcactgagt atacctgcaa ggtgtacccc 300
gtccaggaag ccccgccgt gctggagccc tatgagcggc tgcctccgca caagcatgig 360
gctcgcccca ctgaggtcct ggctgggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc 420

```

catggggaca tgcacagcct ggtgcgaagc cgccaccgta tccctgagcc tgaggctgcc 480
gtgtctcttc gccagatggc caccgccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggctcctg 540
cgtgatctca agctgtgtcg ctttgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctgggtcgtg 600
gagaacctgg aggactcctg cgtgtctgact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac 660
gcgtgcccag cctacgtggg acctgagata ctacgtctac gggcctcata ctcgggcaag 720
gcagccgatg tctggagcct gggcgtggcg ctcttcacca tgcctggccgg ccactacccc 780
ttccaggact cggagcctgt cctgtctctc ggcaagatcc gccgcggggc ctacgccttg 840
cctgcaggcc tctcggtccc tgcctgctgt ctggttcgtt gcctccttcg tcggtgagcca 900
gctgaacggc tcacagccac aggcatcctc ctgcaccctt ggctgcgaca ggacccgatg 960
cccttagccc caaccgatc ccatctctgg gaggtgtccc aggttggtccc tgatggctctg 1020
gggctggacg aagccaggga agaggaggga gacagagaag tggttctgtg tggc 1074

```

<210> 6

<211> 358

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

35

40

45

Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr

50

55

60

Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys

85

90

95

6/26

Lys Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Pro Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala
100 105 110

Arg Leu Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala
115 120 125

Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met
130 135 140

His Ser Leu Val Arg Ser Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala
145 150 155 160

Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His
165 170 175

Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp
180 185 190

Arg Glu Arg Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val
195 200 205

Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala
210 215 220

Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys
225 230 235 240

Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala
245 250 255

Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys
260 265 270

Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala
275 280 285

Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu
290 295 300

Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met
305 310 315 320

Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val

7/26

325

330

335

Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg

340

345

350

Glu Val Val Leu Tyr Gly

355

<210> 7

<211> 1074

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

atgcgagcca cccctctagc tgctcctgcg gggtccctgt ccaggaagaa gcggttggag	60
ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag	120
cccagactgc cccctgcct gtgtcccctg agcccaccta ctgctccaga tctgtcaact	180
gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggcc tatgtcctcc tggagcccga ggagggcggg	240
cgggcctacc gggccctgca ctgccctaca ggcactgagt atacctgcaa ggtgtacccc	300
gtccaggaag ccccggccgt gctggagccc tatgcgcggc tgcccccgca caagcatgtg	360
gctcggccca ctgaggctct ggctgggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc	420
catggggaca tgcacagcct ggtgcgaagc cgccaccgta tccctgagcc tgaggctgcc	480
gtgctcttcc gccagatggc caccgccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggctcctg	540
cgtgatctca agctgtgtcg ctgtgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctggtgctg	600
gagaacctgg aggactcctg cgtgtgtgact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac	660
gcgtgcccag cctacgtggg acctgagata ctgagctcac gggcctcata ctggggaag	720
gcagccgatg tctggagcct gggcgtggcg ctcttcacca tgcctggccgg ccactacccc	780
ttccaggact cggagcctgt cctgtctctc ggcaagatcc gccgcggggc ctacgccttg	840
cctgcaggcc tctcggcccc tggccgtgt ctggttcgt gcctccttcg tgggagcca	900
gctgaacggc tcacagccac aggcattctc ctgcacccct ggctgcgaca ggacccgatg	960
cccttagccc caaccgatc ccattctcgg gaggtgtccc aggtgggtccc tgatggctctg	1020
gggctggacg aagccaggga agaggaggga gacagagaag tggttctgta tggc	1074

8/26

<210> 8

<211> 358

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

35

40

45

Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr

50

55

60

Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Arg Ala Tyr Arg Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys

85

90

95

Lys Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Pro Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala

100

105

110

Arg Leu Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala

115

120

125

Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met

130

135

140

His Ser Leu Val Arg Ser Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala

145

150

155

160

Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His

165

170

175

Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp

9/26

180 185 190
Arg Glu Arg Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val
195 200 205
Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala
210 215 220
Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys
225 230 235 240
Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala
245 250 255
Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys
260 265 270
Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala
275 280 285
Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu
290 295 300
Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met
305 310 315 320
Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val
325 330 335
Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg
340 345 350
Glu Val Val Leu Tyr Gly
355

<210> 9

<211> 1074

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

10/26

```

aigcgagcca cccctctggc tgcctctgcg ggttccctgt ccaggaagaa gcggttggag    60
ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag    120
cccagactgc cccctgcct gtggcccttg agcccaccia ctgctccaga tcgtgcaact    180
gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggccc tatgtcctcc tggagcccga ggagggcggg    240
cgggcctacc aggccctgca ctgccctaca ggcactgagt atacctgcaa ggtgtacccc    300
gtccaggaag ccttggccgt gctggagccc tacgcgcggc tgcctccgca caagcatgtg    360
gctcggccca ctgaggctct ggctgggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc    420
catggggaca tgcacagcct ggtgcgaacg cgccaccgia tccctgagcc tgaggctgcc    480
gtgctcttcc gccagatggc caccgccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggctctg    540
cgtgatctca agctgtgtcg ctttgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctgggtctg    600
gagaacctgg aggactcctg cgtgtgtact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac    660
gcgtgcccag cctacgtggg acctgagata ctacagctac gggcctcata ctggggcaag    720
gcagccgatg tctggagcct gggcgtggcg ctcttcacca tgcctggccg ccactacccc    780
ttccaggact cggagcctgt cctgtcttcc ggcaagatcc gccgcggggc ctacgccttg    840
cctgcaggcc tctcggcccc tgcctcgtgt ctggttcgtt gcctccttcg tcgggagcca    900
gcigaacggc tcacagccac aggcattctc ctgcaccctt ggctgcgaca ggacccgatg    960
cccttagccc caaccgatc ccatctcttg gaggcctgcc aggtgggtccc tgatggactg   1020
gggctggacg aagccaggga agaggaggga gacagagaag tggttctgta tggc         1074

```

<210> 10

<211> 358

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

11/26

35	40	45	
Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr			
50	55	60	
Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly			
65	70	75	80
Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys			
85	90	95	
Lys Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Leu Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala			
100	105	110	
Arg Leu Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala			
115	120	125	
Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met			
130	135	140	
His Ser Leu Val Arg Thr Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala			
145	150	155	160
Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His			
165	170	175	
Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp			
180	185	190	
Arg Glu Arg Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val			
195	200	205	
Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala			
210	215	220	
Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys			
225	230	235	240
Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala			
245	250	255	
Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys			
260	265	270	

12/26

Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala

275

280

285

Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu

290

295

300

Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met

305

310

315

320

Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val

325

330

335

Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg

340

345

350

Glu Val Val Leu Tyr Gly

355

<210> 11

<211> 969

<212> PRT

<213> Human

<400> 11

atgcgagcca cccctttggc tgcctctgcg ggttcctgt ccaggaagaa gcggttggag 60
ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag 120
cccagactgc cccctgcct gttgcccctg agcccaccta ctgctccaga tcgtgcaact 180
gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggccc tatgtcctcc tggagcccga ggagggcggg 240
cgggcctacc aggccctgca ctgcctaca ggcactgagt atacctgcaa ggtgtacccc 300
gtccaggaag ccttggccgt gctggaacce tatgcgcggc tgccccgga caagcatgtg 360
gcttggccca ctgagggcct ggctgggtacc caacttctct acgccttttt cacttggacc 420
catggggaca tgcacaggct gatagggcac acgccctgtg cgcactgtga ccagacacgg 480
aagaagctgg tgctggagaa cctggaggac tcctgcgtgc tgactgggcc agatgatgcc 540
ctgtgggaca agcacgcgtg ccagccctac gtgggacctg agatactcag ctacacgggc 600
tcatactcgg gcaaggcagc caatgtctgg agcctggggc tggcgctctt caccatgctg 660

```

gccggccact accccticca ggactcggag cciglccigc tcttcggcaa gatccgccgc 720
ggggcctacg ccttgccigc aggcctctcg gcccctgccc gctgtctggt tcgctgcctc 780
cttcgtcggg agccagctga acggctcaca gccacaggca tcttcctgca cccctggctg 840
cgacaggacc cgatgccctt agccccaacc cgatcccatc tctgggaggc tgcccaggig 900
gtccctgatg gactggggct ggacgaagcc agggaagagg agggagacag agaagtgggt 960
ctglatggc 969

```

<210> 12

<211> 323

<212> PRT

<213> Human

<400> 12

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ser Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

35

40

45

Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr

50

55

60

Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys

85

90

95

Lys Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Leu Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala

100

105

110

Arg Leu Pro Pro Asp Lys His Val Ala Trp Pro Thr Glu Gly Leu Ala

115

120

125

Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Trp Thr His Gly Asp Met

14/26

130 135 140
His Arg Leu Ile Gly His Thr Pro Cys Ala His Cys Asp Gln Thr Arg
145 150 155 160
Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val Leu Thr Gly
165 170 175
Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala Tyr Val Gly
180 185 190
Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys Ala Ala Asn
195 200 205
Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala Gly His Tyr
210 215 220
Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys Ile Arg Arg
225 230 235 240
Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala Arg Cys Leu
245 250 255
Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu Thr Ala Thr
260 265 270
Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met Pro Leu Ala
275 280 285
Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val Pro Asp Gly
290 295 300
Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg Glu Val Val
305 310 315 320
Leu Tyr Gly

<210> 13

<211> 1074

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

```

atgcgagcca cccctctggc tgcctctgcg ggttccctgt ccaggaagaa gcggttggag    60
ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag    120
cccagactgc cccctgcct gttgccccctg agcccaccta ctgctccaga tcgtgcaact    180
gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggccc tatgtcctcc tggagcccga ggaggcgagg    240
cgggcctacc aggccctgca ctgccctaca ggcactgagt atacctgcag ggtgtacccc    300
gtccaggaag ccttggccgt gctggagccc tatgcgcggc tgcctccgca caagcatgtg    360
gctcggccca ctgaggctct ggctgggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc    420
catggggaca tgcacagcct ggtgcgaagc cgccaccgta tccctgagcc tgaggctgcc    480
gtgctcttcc gccagatggc caccgcccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggctcctg    540
cgtgatctca agctgtgtcg ctttgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctgggtgtg    600
gagaacctgg aggactcctg cgtgctgact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac    660
gcgtgcccag cctacgtggg acctgagata ctacgtcac gggcctcata ctcgggcaag    720
gcagccgatg tctggagcct gggcgtggcg ctcttcacca tgcctggccgg ccactacccc    780
ttccaggact cggagcctgt cctgctcttc ggcaagatcc gccgcggggc ctacgccttg    840
cctgcaggcc tctcggcccc tgcctcgtgt ctgggtcgtt gcctccttcg tcgggagcca    900
gctgaacggc tcacagccac aggcattctc ctgcaccctt ggctgcgaca ggaccgatg    960
cccttagccc caaccgatc ccatctctgg gaggtgccc aggttggtccc tgatggactg   1020
gggctggacg aagccaggga agaggaggga gacagagaag tggttctgta tggc       1074

```

<210> 14

<211> 358

<212> PRT

<213> Human

<400> 14

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu
35 40 45
Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr
50 55 60
Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly
65 70 75 80
Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys
85 90 95
Arg Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Leu Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala
100 105 110
Arg Leu Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala
115 120 125
Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met
130 135 140
His Ser Leu Val Arg Ser Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala
145 150 155 160
Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His
165 170 175
Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp
180 185 190
Arg Glu Arg Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val
195 200 205
Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala
210 215 220
Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys
225 230 235 240
Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala
245 250 255
Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys

260 265 270
 Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala
 275 280 285
 Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu
 290 295 300
 Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val
 325 330 335
 Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg
 340 345 350
 Glu Val Val Leu Tyr Gly
 355

<210> 15

<211> 1074

<212> DNA

<213> Human

<400> 15

atgcgagcca cccctctggc tgctcctgcg ggttcctgt ccaggaagaa gcggttggag 60
 ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag 120
 cccagactgc cccctgcct gtgccccctg agcccaccta ctgctccaga tctgtcaact 180
 gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggcc tatgtcctcc tggagcccga ggagggcggg 240
 cgggcctacc aggccctgca ctgccctaca ggcactgagt atacctgcag ggtgtacccc 300
 gtccaggaag ccttggccgt gctggagccc tatgcgcggc tgcccccgca caagcatgtg 360
 gctcggccca ctgaggtcct ggctgggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc 420
 catggggaca tgcacagcct ggtgcgaagc cgccaccgta tccctgagcc tgaggctgcc 480
 gtgctcttcc gccagatggc caccgccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggctctg 540
 cgtgatctca agctgtgtcg ctltgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctggtgtctg 600

gagaacctgg aggactcctg cgigctgact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac 660
 gcgtgcccag cctacgtggg acctgagata ctacgtcac gggcctcata ctgggcaag 720
 gcagccgatg tctggagcct gggcgtggcg ctcttcacca tgctggccgg ccactacccc 780
 ttccaggact cggagcctgt cctgctcttc ggcaagatcc gccgcggggc ctacgccttg 840
 cctgcaggcc tctcggtccc tggcgcgtgt ctggttcgt gcctccttcg tcgggagcca 900
 gctgaacggc tcacagccac aggcatcctc ctgcaccct ggctgcgaca ggaccgatg 960
 cccttagccc caaccgatc ccatctctgg gaggtgccc aggtggtccc tgatggactg 1020
 gggctggacg aagccaggga agaggaggga gacagagaag tggttctgta tggc 1074

<210> 16

<211> 358

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

35

40

45

Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr

50

55

60

Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys

85

90

95

Arg Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Leu Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala

100

105

110

Arg Leu Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala

19/26

115	120	125	
Gly Thr Gln Leu Leu Tyr	Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met		
130	135	140	
His Ser Leu Val Arg Ser Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala			
145	150	155	160
Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His			
165	170	175	
Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp			
180	185	190	
Arg Glu Arg Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val			
195	200	205	
Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala			
210	215	220	
Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys			
225	230	235	240
Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala			
245	250	255	
Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys			
260	265	270	
Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala			
275	280	285	
Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu			
290	295	300	
Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met			
305	310	315	320
Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val			
325	330	335	
Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg			
340	345	350	

Glu Val Val Leu Tyr Gly

355

<210> 17

<211> 1074

<212> DNA

<213> Human

<400> 17

```
atgcgagcca cccctctggc tgcctctgcg ggttcctgt ccaggaagaa gcggttggag    60
ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag    120
cccagactgc cccctgcct gtggccctg agcccacta ctgctccaga tctgtcaact    180
gctgtggcca ctgctcccg tctggggccc tatgtcctcc tggagcccga ggagggcggg    240
cgggcctacc aggccctgca ctgcccata ggcactgagt atacctgcaa ggtgtacccc    300
gtccaggaag ccttggccgt gctggagccc tatgcgcggc tgcccccgca caagcatgtg    360
gctcggccca ctgaggtcct ggctgggtacc cagctcctct acgccttttt cactcggacc    420
catggggaca tgcacagcct ggtgcgaagc cgccaccgta tccctgagcc tgaggctgcc    480
gtgctcttcc gccagatggc caccgcccig gcgcactgtc accagcacgg tctggctctg    540
cgtgatctca agcttgtctg ctttgtcttc gctgaccgtg agaggaagaa gctgggtgctg    600
gagaacctgg aggactcctg cgtgctgact gggccagatg attccctgtg ggacaagcac    660
gcgtgcccag cctacgtggg acctgagata ctgagctcac gggcctcata ctggggaag    720
gcagccgatg tctggagcct gggcgtggcg ctcttcacca tgctggccgg ccactacccc    780
ttccaggact cggagcctgt cctgctcttc ggcaagatcc gccgcggggc ctacgccttg    840
cctgcaggcc tctcggcccc tgcccgtgt ctggttcgt gcctccttcg tcgggagcca    900
gctgaacggc tcacagccac aggcatcctc ctgcacccct ggctgcgaca ggacccgatg    960
cccttagccc caaccgatc ccatctctgg gaggtgccc aggtgggtccc tgatggactg   1020
gggctggacg aagccaggga agaggaggga gacagagaag tggttctgta tggc       1074
```

<210> 18

<211> 358

<212> PRT

<213> Human

<400> 18

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

35

40

45

Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr

50

55

60

Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys

85

90

95

Lys Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Leu Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala

100

105

110

Arg Leu Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala

115

120

125

Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met

130

135

140

His Ser Leu Val Arg Ser Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala

145

150

155

160

Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His

165

170

175

Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp

180

185

190

Arg Glu Arg Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser Cys Val

195

200

205

22/26

Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys Pro Ala
 210 215 220
 Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Lys
 225 230 235 240
 Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met Leu Ala
 245 250 255
 Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe Gly Lys
 260 265 270
 Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala
 275 280 285
 Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu Arg Leu
 290 295 300
 Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp Pro Met
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln Val Val
 325 330 335
 Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly Asp Arg
 340 345 350
 Glu Val Val Leu Tyr Gly
 355

<210> 19

<211> 1080

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

atgcgagcca cccctctggc tgctcctgcg gggtccctgt ccaggaagaa gcggttggag 60
 ttggatgaca acttagatac cgagcgtccc gtccagaaac gagctcgaag tgggccccag 120
 cccagactgc cccctgcct gtgccccctg agcccaccta ctgctccaga tcgtgcaact 180

gctgtggcca ctgcctcccg tcttggggccc tatgtccicc tggagcccga ggagggcggg 240
 cgggcctacc aggccctgca ctgccctaca ggcactgagt ataccigcaa gggtgacccc 300
 gtccaggaag ccttggccgt gctggagccc tatgcgcggg tgcccccgca caagcatgtg 360
 gctcggccca ctgaggtcct ggctgggtacc cagctccctc acgccttttt cactcggacc 420
 catggggaca tgcacagcct gggtcgaagc cgccaccgia tccctgagcc tgaggctgcc 480
 gtgctcttcc gccagatggc caccgcccctg gcgcactgtc accagcacgg tctggctcctg 540
 cgtgatctca agctgtgtcg ctttgccttc gctgaccgtg accgtgagaa gaagaagctg 600
 gtgctggaga acctggagga ctcttgcgtg ctgactgggc cagatgattc cctgtgggac 660
 aagcacgcgt gccagcccta cgtgggacct gagatactca gctcacgggc ctcatactcg 720
 ggcaaggcag ccgatgtctg gagcctgggc gtggcgctct tcacatgct ggccggccac 780
 taccctttcc aggactcgga gcctgtcctg ctcttcggca agatccgccg cggggcctac 840
 gccttgccctg caggcctctc ggccccctgcc cgctgtctgg ttcgctgcct ccttcgtcgg 900
 gagccagctg aacggctcac agccacaggc atcctcctgc acccctggct gcgacaggac 960
 ccgatgccct tagccccaac ccgataccat ctctgggagg ctgccaggt ggtccctgat 1020
 ggactggggc tggacgaagc cagggaagag gagggagaca gagaagtggg tctgtatggc 1080

<210> 20

<211> 360

<212> PRT

<213> Human

<400> 20

Met Arg Ala Thr Pro Leu Ala Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Arg Lys

5

10

15

Lys Arg Leu Glu Leu Asp Asp Asn Leu Asp Thr Glu Arg Pro Val Gln

20

25

30

Lys Arg Ala Arg Ser Gly Pro Gln Pro Arg Leu Pro Pro Cys Leu Leu

35

40

45

Pro Leu Ser Pro Pro Thr Ala Pro Asp Arg Ala Thr Ala Val Ala Thr

50

55

60

Ala Ser Arg Leu Gly Pro Tyr Val Leu Leu Glu Pro Glu Glu Gly Gly
 65 70 75 80
 Arg Ala Tyr Gln Ala Leu His Cys Pro Thr Gly Thr Glu Tyr Thr Cys
 85 90 95
 Lys Val Tyr Pro Val Gln Glu Ala Leu Ala Val Leu Glu Pro Tyr Ala
 100 105 110
 Arg Val Pro Pro His Lys His Val Ala Arg Pro Thr Glu Val Leu Ala
 115 120 125
 Gly Thr Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Phe Thr Arg Thr His Gly Asp Met
 130 135 140
 His Ser Leu Val Arg Ser Arg His Arg Ile Pro Glu Pro Glu Ala Ala
 145 150 155 160
 Val Leu Phe Arg Gln Met Ala Thr Ala Leu Ala His Cys His Gln His
 165 170 175
 Gly Leu Val Leu Arg Asp Leu Lys Leu Cys Arg Phe Val Phe Ala Asp
 180 185 190
 Arg Asp Arg Glu Lys Lys Lys Leu Val Leu Glu Asn Leu Glu Asp Ser
 195 200 205
 Cys Val Leu Thr Gly Pro Asp Asp Ser Leu Trp Asp Lys His Ala Cys
 210 215 220
 Pro Ala Tyr Val Gly Pro Glu Ile Leu Ser Ser Arg Ala Ser Tyr Ser
 225 230 235 240
 Gly Lys Ala Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Val Ala Leu Phe Thr Met
 245 250 255
 Leu Ala Gly His Tyr Pro Phe Gln Asp Ser Glu Pro Val Leu Leu Phe
 260 265 270
 Gly Lys Ile Arg Arg Gly Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Gly Leu Ser Ala
 275 280 285
 Pro Ala Arg Cys Leu Val Arg Cys Leu Leu Arg Arg Glu Pro Ala Glu

290 295 300
Arg Leu Thr Ala Thr Gly Ile Leu Leu His Pro Trp Leu Arg Gln Asp
305 310 315 320
Pro Met Pro Leu Ala Pro Thr Arg Ser His Leu Trp Glu Ala Ala Gln
325 330 335
Val Val Pro Asp Gly Leu Gly Leu Asp Glu Ala Arg Glu Glu Glu Gly
340 345 350
Asp Arg Glu Val Val Leu Tyr Gly
355 360

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

caccatgcga gccacatctc tggctgcttc 30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

gctctagcca tacagcccca cctcccccttc 30

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

gccatacaga accatttctc tgtctcc

27

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

gccgcatga gcgacgtggc tattgtgaag

30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

aggatgagcc ggtcgtcgtg ccggactatc

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, A61K31/7088, A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, A61K31/7088, A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/38503 A1 (Sugen, Inc.), 31 May, 2001 (31.05.01), Fig. 2 & EP 1240194 A & JP 2003-514583 A	3-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 December, 2003 (11.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11631

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20-21, 38-39
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
They involve methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☒ Claims Nos.: 1-2, 14, 17-19, 22-24, 32, 35-37, 40
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 3-5

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11631

(Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet(1))

The preventives/remedies as set forth in claims 1 and 2 require the acquisition of "a compound or its salt inhibiting the activity of a protein having an amino acid sequence, which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, its peptide fragment or a salt thereof" and involve preventives/remedies containing any compounds and salts thereof having the above inhibitory effects.

However, no specific compound or its salt having such an inhibitory effect is presented in the description. Therefore, claims 1 and 2 are neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific substances are involved in the scope and what are not. Namely, claims 1 and 2 are described in an extremely unclear manner.

Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions according to claims 1 and 2.

For the same reason, no meaningful search can be made on claims 14, 17 to 19, 22 to 24, 32, 35 to 37 and 40 too.

(Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1))

The matter common to claims 3 to 5, 6 to 10, 11, 12 to 13, 15 to 16, 25 to 26, 27 to 29, 30 to 31 and 33 to 34 resides in a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

As the results of the search, however, it is found out that this protein is not novel because of having been reported in a document WO 01/38503 A2 (SUGEN, INC.), 31 May, 2001 (31.05.01).

Consequently, the above protein falls within the category of prior art and, therefore, this common matter is not regarded as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Accordingly, there is no matter common to all claims.

Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, these inventions differing from each other have no special technical relevancy in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is obvious that claims 3 to 5, 6 to 10, 11, 12 to 13, 15 to 16, 25 to 26, 27 to 29, 30 to 31 and 33 to 34 do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/12, A61K31/7088, A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/12, A61K31/7088, A61K38/00, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, C07K16/18, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/38503 A1 (Sugen, Inc.) 2001.05.31, Fig. 2 & EP 1240194 A & JP 2003-514583 A	3-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-21, 38-39 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

ヒトの治療方法を含むものである。

2. ☒ 請求の範囲 1-2, 14, 17-19, 22-24, 32, 35-37, 40 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

(特別ページ参照)

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 3-5

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第1ページ第I欄2. より続く)

請求の範囲1-2に記載の予防・治療剤は、「配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩」の取得を必要とし、そのような阻害作用を有するあらゆる化合物またはその塩を含有する予防・治療薬を包含するものである。

しかしながら、明細書には、そのような阻害作用を有するあらゆる化合物またはその塩としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲1-2は、明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても、該化合物またはその塩には具体的にどのような物質が包含され、どのような物質が包含されないのかが全く不明であって、請求の範囲1-2の記載は著しく不明確である。

したがって、請求の範囲1-2に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

請求の範囲14、17-19、22-24、32、35-37、40についても、同様の理由により、有意義な調査をすることができない。

(第1ページ第II欄より続く)

請求の範囲3-5、6-10、11、12-13、15-16、25-26、27-29、30-31、及び33-34に共通の事項は、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質である。

しかしながら、調査の結果、該タンパク質は、文献WO01/38503 A2 (SUGEN, INC.) 2001.05.31に記載されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、該タンパク質は先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、この共通の事項は、特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。

PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲3-5、6-10、11、12-13、15-16、25-26、27-29、30-31、及び33-34は、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.